



Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Clínica Universitária de Ginecologia e Obstetrícia

O Efeito do Tabaco na Fertilidade Masculina

Ana Rita Rego de Lima

Orientador: Dr. Joaquim Nunes

Lisboa, 2016

Resumo

O fumo do tabaco contém vários agentes químicos, substâncias mutagénicas e carcinogénicas que podem afectar a fertilidade masculina.

Os resultados dos estudos que avaliam os parâmetros seminais nos indivíduos fumadores não têm sido concordantes. Alguns estudos demonstraram uma elevada prevalência de aneuploidia e aumento da fragmentação do DNA dos espermatozóides nos homens fumadores inférteis. Um aumento das espécies reactivas de oxigénio e de leucócitos, assim como uma redução do antioxidante ácido ascórbico no líquido seminal foram relacionados com o consumo do tabaco. Alterações do perfil hormonal com aumento de Testosterona, FSH e LH foram documentadas em fumadores.

Consequências deletérias na fertilidade masculina na idade adulta foram associadas ao consumo materno de tabaco no período pré-natal, destacando-se alterações dos parâmetros seminais e do perfil hormonal, assim como início precoce da puberdade, menor estatura atingida na idade adulta, índice de massa corporal mais elevado e testículos de menor tamanho.

Em casais submetidos a técnicas de procriação medicamente assistida, nos quais o parceiro masculino era fumador, foram constatadas menores taxas de gravidez e de implantação, diminuição dos oócitos aspirados e aumento da taxa de gravidez múltipla.

Abstract

Tobacco smoke contains various chemical agents, mutagens and carcinogens that may affect male fertility.

The results of studies evaluating semen parameters in smoking subjects haven't been consistent. Studies have shown a high prevalence of aneuploidy and increased DNA fragmentation of sperm in smoking infertile men. An increase in reactive oxygen species and leukocytes, as well as a reduction of the antioxidant ascorbic acid in seminal fluid were associated with cigarette smoking. Changes in the hormonal profile with increased Testosterone, FSH and LH have been documented in smokers.

Deleterious effects on male fertility in adulthood were associated with maternal cigarette smoking in the prenatal period, highlighting changes in the seminal parameters and hormonal profile, as well as early onset of puberty, reduced height reached in adulthood, higher body mass index and smaller testicles.

In couples undergoing assisted reproductive techniques, in which the male partner was a smoker, it was found lower pregnancy and implantation rates, decreased oocytes retrieved and increased rate of multiple pregnancy.

Índice

Capítulo 1 – Introdução.....	5
Capítulo 2 – Metodologia.....	6
Capítulo 3 – Resultados	7
3.1 - Enquadramento Anátomo-Fisiológico da Fertilidade Masculina	7
3.1.1 - Descrição Anatômica dos Genitais Masculinos	7
3.1.2 – Espermatogénese	9
3.1.3 - Regulação Hormonal da Espermatogénese.....	12
3.2 - Os Efeitos do Tabaco na Fertilidade Masculina	14
3.2.1 - Constituição do Tabaco	14
3.2.2 - Os Efeitos dos Principais Constituintes do Tabaco	14
3.2.3 - Alterações nos Parâmetros Seminais	15
3.2.4 - Alterações na Espermatogénese	17
3.2.5 - Alterações nos Espermatozóides	17
3.2.6 - Alterações Cromossómicas e no DNA dos Espermatozóides	18
3.2.7 - Alterações no Eixo Hipotálamo-Hipófise-Testículo	21
3.2.8 - Alterações no Líquido Seminal	21
3.2.9 - Exposição Pré-Natal ao Tabaco	23
3.2.10 - Procriação Medicamente Assistida nos Fumadores	24
Capítulo 4 – Discussão.....	26
Capítulo 5 - Conclusão.....	27
Agradecimentos	28
Bibliografia.....	29

Capítulo 1 – Introdução

A infertilidade é definida pela incapacidade de um casal conceber após 12 meses de relações sexuais desprotegidas e regulares.¹

É um problema que afecta cerca de 10-15% dos casais a nível mundial, sendo o factor masculino identificado em cerca de 35% dos casos.¹

Apesar do efeito do tabaco ser amplamente reconhecido como um perigo para a saúde e uma das principais causas de mortalidade, responsável por cerca de 6 milhões de mortes anualmente, a Organização Mundial de Saúde estima que um terço da população a nível mundial seja fumadora, dos quais 47% são homens em idade reprodutiva.^{1, 2, 3, 4} Em Portugal, cerca de 30% da população masculina é fumadora.⁵

Vários estudos realizados têm associado o consumo do tabaco à infertilidade masculina, contudo, o mecanismo molecular envolvido ainda não é bem compreendido.⁶ Segundo dados disponíveis, até 13% da infertilidade poderá ser atribuída ao consumo do tabaco.⁷

A combustão do tabaco liberta cerca de 4000 compostos químicos, substâncias mutagénicas e carcinogénicas, incluindo a nicotina e os seus metabolitos.^{8, 9, 10}

O processo da espermatogénese é apenas iniciado na puberdade e mantido durante toda a vida adulta do homem.¹¹ É durante este período que a espermatogénese se encontra vulnerável aos efeitos adversos resultantes do estilo de vida e/ou à exposição a agentes tóxicos ambientais.¹¹ As bases para a espermatogénese são construídas durante a vida fetal, e cada vez mais é reconhecido que perturbações durante este período poderão ter impacto na espermatogénese durante a vida adulta.¹¹

Esta dissertação de mestrado tem como objectivo demonstrar as alterações induzidas pelo consumo do tabaco na fertilidade masculina, avaliando desta forma se o tabaco será uma possível causa de infertilidade masculina.

Capítulo 2 – Metodologia

Foi realizada uma pesquisa na base de dados PubMed e nas revistas *Fertility & Sterility*, *Human Reproduction* e *Journal of Andrology* utilizando as seguintes palavras-chave: *male infertility*; *cigarette smoking*; *nicotine*; *spermatogenesis*; *sperm*; *semen*; *assisted reproductive techniques*. Os critérios utilizados foram os seguintes: (i) artigos publicados na língua inglesa; (ii) artigos publicados entre os anos 2000 e 2016.

Desta pesquisa obtive cerca de 1000 artigos como resultado, dos quais cerca de 900 foram excluídos após ler o título e/ou resumo por não se adequarem ao tema a que me proponho abordar ou porque não tive acesso ao artigo completo. Dos restantes 100, após ler os artigos, exclui cerca de metade por considerar que a metodologia com que o estudo foi conduzido não excluía a possibilidade dos resultados obtidos terem sido influenciados por outros factores além do tabaco.

Também foram consultados alguns capítulos de livros com o objectivo de enquadrar o tema abordado.

Os testículos são órgãos secretores e excretores destinados a produzir o elemento principal do líquido espermático - os espermatozóides -, apresentando ainda uma glândula endócrina, com funções na determinação dos caracteres sexuais secundários.¹²

Os epidídimos são órgãos excretores, no interior dos quais se encontra o canal epididimário.¹²

As vias espermáticas (Figura 2) são canais que conduzem o líquido espermático desde os túbulos seminíferos, que se encontram nos lóbulos do testículo, até à uretra uro-genital. As vias espermáticas são constituídas pela reunião dos túbulos seminíferos, formando os canais rectos, estes, por sua vez, confluem formando a rede testicular de Haller. Esta converge, formando sucessivamente os canais eferentes, canal epididimário e canal deferente. A terminação das vesículas seminais reúne-se ao canal deferente, dando origem ao canal ejaculador que se abre na uretra prostática. A uretra uro-genital termina no meato urinário.¹²

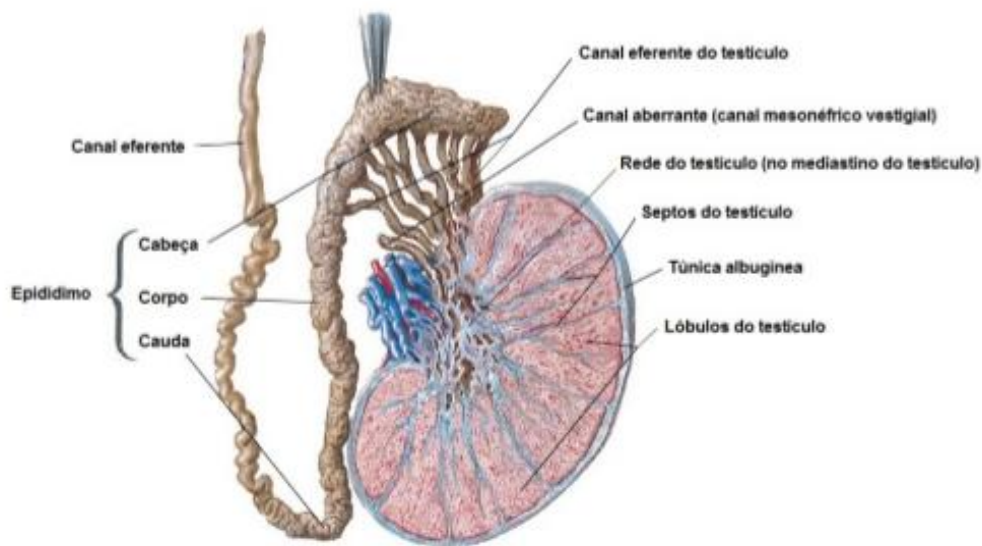


Figura 2 – Esquema representativo do testículo e vias espermáticas numa secção frontal (adaptado de 13)

As vesículas seminais são reservatórios que acumulam o líquido espermático à medida que este se vai produzindo.¹²

A próstata tem como função produzir líquido prostático que é expulso durante a ejaculação, conferindo aos espermatozóides propriedades activadoras e mobilizadoras.¹²

As glândulas bulbo-rectais são constituídas pela glândula propriamente dita e pelo canal excretor.¹²

3.1.2 – Espermatogénese

A espermatogénese corresponde ao processo de formação dos espermatozóides. Inicia-se por volta dos 13 anos e continua na maior parte da vida, reduzindo-se acentuadamente na velhice. Ocorre nos túbulos seminíferos durante a vida sexual activa, por estimulação das hormonas gonadotrópicas da hipófise anterior.¹⁴

Durante o desenvolvimento do embrião, as células germinativas primordiais migram para o testículo formando as espermatogónias, que revestem internamente os túbulos seminíferos em duas ou três camadas. Na puberdade, as espermatogónias iniciam divisões mitóticas, proliferando e diferenciando-se nos diversos estadios de desenvolvimento até formar o espermatozóide. No primeiro estadio, as espermatogónias migram entre as células de Sertoli em direcção ao lúmen dos túbulos seminíferos, tornando-se progressivamente alargadas e modificadas em espermatócitos primários. Por sua vez, cada um deles sofre divisão meiótica, formando-se os espermatócitos secundários. Poucos dias depois, estes completam a segunda divisão meiótica, formando as espermatídes. Dos 46 cromossomas do espermatócito primário, 23 cromossomas vão para uma espermatíde e os outros 23 para uma segunda espermatíde. Estas serão posteriormente modificadas em espermatozóides. Na figura 3 estão representadas as referidas etapas da espermatogénese. Todo o período de espermatogénese, desde a espermatogónia ao espermatozóide, dura aproximadamente 74 dias.¹⁴

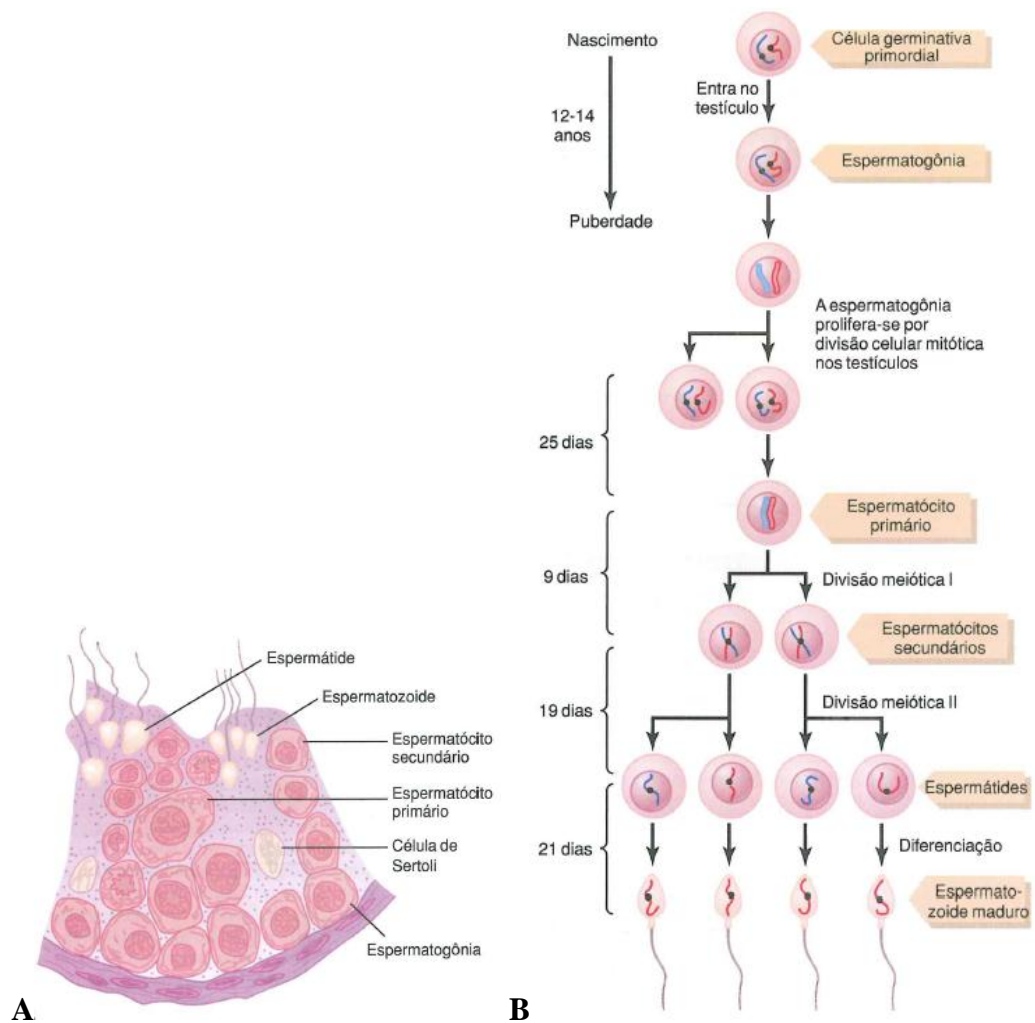


Figura 3 – Etapas da Espermatogênese; A: Estádios de Desenvolvimento do Espermatozoide; B: Divisões Celulares da Espermatogênese; (retirado de 14)

As células de Sertoli têm um papel essencial durante a espermatogênese, visto que as suas barreiras citoplasmáticas circundam as espermatogônias em desenvolvimento durante todo o seu trajecto até ao lúmen do túbulo seminífero.¹⁴ A proliferação das células de Sertoli na vida fetal é essencial, pois o número de espermatozoides produzidos na vida adulta está intimamente relacionado com o número de células de Sertoli existentes nos testículos, visto que estas apenas conseguem suportar o desenvolvimento de um número finito de células germinativas em espermatozoides.¹¹ As células de Sertoli proliferam na vida fetal, período neonatal até à puberdade.¹¹ É possível que factores ambientais e estilo de vida interfiram na

proliferação das células de Sertoli, comprometendo assim o número final destas células e, conseqüentemente, o número de espermatozóides produzidos na vida adulta.¹¹

Tal como representado na figura 4, cada espermatozóide é composto por uma cabeça e uma cauda. A cabeça é constituída maioritariamente pelo núcleo da célula e uma fina camada citoplasmática e membrana plasmática. Nos dois terços anteriores da cabeça, na parte externa, encontra-se o acrossoma que é formado principalmente por enzimas proteolíticas e hialuronidase essenciais à fertilização do oócito. A cauda do espermatozóide é constituída pelo axonema, que confere mobilidade ao espermatozóide, uma fina membrana celular recobrindo o axonema e um conjunto de mitocôndrias na porção proximal da cauda, que produzem a energia necessária ao movimento do espermatozóide.¹⁴

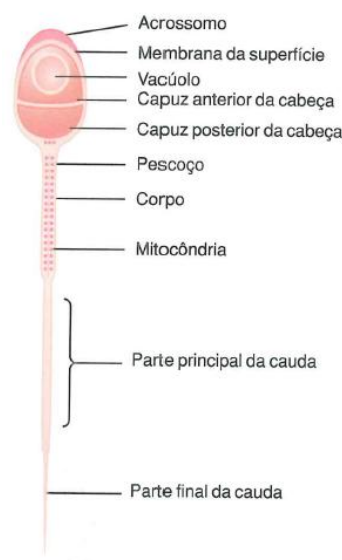


Figura 4 - Estrutura do Espermatozóide (retirado de 14)

Os testículos de um adulto podem formar até 120 milhões de espermatozóides por dia. Estes poderão ser armazenados até 1 mês no canal deferente e em menor quantidade no epidídimo.¹⁴

O espermatozóide que é ejaculado durante o acto sexual masculino é composto, aproximadamente em 10% por espermatozóides, 60% de líquido produzido nas glândulas seminais, 30 % de líquido prostático e pequenas quantidades produzidas pelas glândulas bulbo-rectais.¹⁴

3.1.3 - Regulação Hormonal da Espermatogénese

A maior parte do controlo das funções sexuais começa com a secreção da Hormona Libertadora das Gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo. Esta hormona estimula a hipófise anterior a secretar duas outras hormonas, chamadas hormonas gonadotrópicas: a Hormona Luteinizante (LH) e a Hormona Folículo-Estimulante (FSH). A LH é o estímulo primário para a secreção de Testosterona pelos testículos e a FSH estimula principalmente a espermatogénese.¹⁴

A GnRH é secretada pelos neurónios do hipotálamo durante alguns minutos, uma vez em cada 1 a 3 horas, sendo que a intensidade deste estímulo hormonal é determinada pela frequência e pela quantidade de GnRH libertada em cada ciclo. De seguida, a GnRH é libertada no sistema vascular porta hipotalâmico-hipofisário, sendo transportada pela circulação até à hipófise anterior, onde vai estimular a libertação das hormonas gonadotrópicas – LH e FSH. A secreção de LH pela hipófise anterior também é cíclica, seguindo o padrão de libertação pulsátil da GnRH. Contudo, a secreção de FSH aumenta e diminui ligeiramente a cada flutuação da secreção da GnRH.¹⁴

A LH tem como função estimular as células de Leydig, localizadas no interstício do testículo, a secretar Testosterona, enquanto que a FSH estimula as células de Sertoli, permitindo a conversão de espermatídes em espermatozóides.¹⁴

Todo este processo é controlado por um mecanismo de feedback negativo do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, tal como representa a figura 5.¹⁴

A Testosterona secretada pelos testículos em resposta à LH tem o efeito recíproco de inibir a secreção de LH pela hipófise anterior. Esta inibição resulta de um efeito directo da Testosterona sobre o hipotálamo, reduzindo a secreção de GnRH. Este, por sua vez, leva a uma diminuição da secreção de LH e FSH pela hipófise anterior e, a redução de LH leva, subsequentemente, a uma diminuição da secreção de Testosterona produzida nos testículos. Assim, sempre que a secreção de Testosterona se tornar muito elevada, este efeito de feedback negativo reduz a sua secreção para o nível desejado. Por outro lado, quantidades reduzidas de Testosterona induzem o hipotálamo a secretar GnRH, aumentando assim a secreção de LH e FSH pela hipófise anterior e, consequentemente, a Testosterona produzida pelos testículos.¹⁴

Quando os túbulos seminíferos reduzem a produção de espermatozóides, a secreção de FSH pela hipófise anterior aumenta acentuadamente. Por outro lado, quando a espermatogénese ocorre rapidamente, a secreção de FSH pela hipófise diminui. Este efeito de feedback negativo sobre a hipófise anterior é devido à secreção da hormona Inibina pelas células de Sertoli. Esta hormona actua tanto na hipófise anterior inibindo a secreção de FSH, como no hipotálamo inibindo a secreção de GnRH. Desta forma, o seu potente efeito de feedback inibitório sobre o hipotálamo e sobre a hipófise anterior fornece um mecanismo importante de feedback negativo para o controlo da espermatogénese e secreção de Testosterona.¹⁴

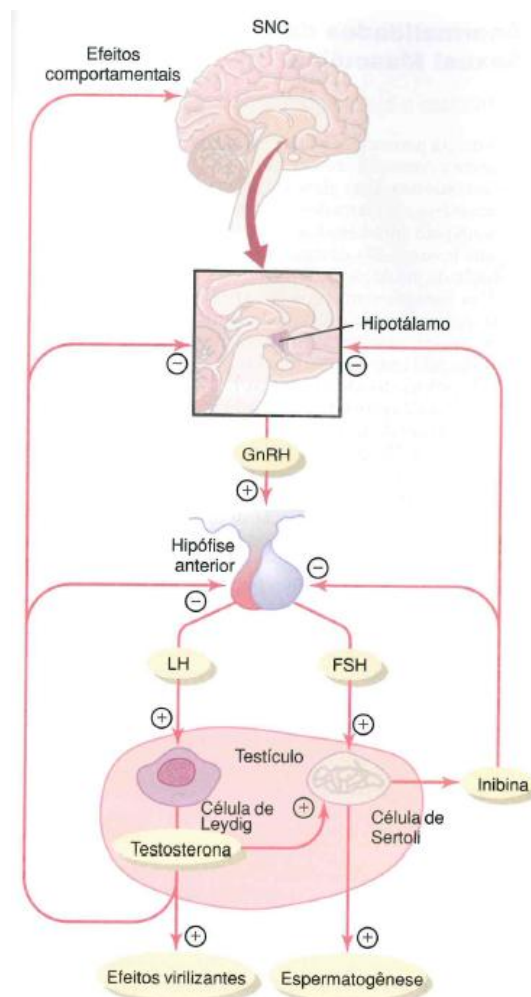


Figura 5 - Regulação Hormonal do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Testículo
(retirado de 14)

3.2 - Os Efeitos do Tabaco na Fertilidade Masculina

3.2.1 - Constituição do Tabaco

O tabaco é composto por gases, líquido vaporizado e partículas.⁸ A sua combustão liberta cerca de 4000 compostos químicos de forma bifásica.⁸ Na fase gasosa, há a libertação de monóxido de carbono e, na fase particulada, há a libertação de nicotina e alcatrão.⁸ O fumo do tabaco também contém mais de 30 agentes químicos, substâncias mutagénicas e carcinogénicas, incluindo a nicotina e seus metabolitos, benzopireno, cádmio, chumbo, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, nafetaleno entre outros.^{8, 9, 10}

A nicotina é o componente psicoactivo primário do tabaco, sendo responsável pela adicção. A maioria da nicotina é metabolizada a cotinina, e esta, por sua vez, é metabolizada em trans-3-hidroxicotinina (3HC).⁸

3.2.2 - Os Efeitos dos Principais Constituintes do Tabaco

Nicotina e os seus Metabolitos

Os efeitos tóxicos da nicotina provaram ser dose-dependentes, visto que apenas níveis elevados de nicotina (>1mM) diminuíram significativamente a motilidade dos espermatozóides.¹⁵ Um estudo realizado em ratos verificou que a nicotina induz a apoptose das células de Leydig, sugerindo que também poderá influenciar as hormonas reprodutoras masculinas.¹⁶

A nicotina também foi associada a alterações degenerativas dos túbulos seminíferos revelados pela alteração da arquitectura tubular, diminuição da espessura das células espermatogénicas, vacuolização das células de Sertoli e uma lâmina basal espessada, sendo que estas alterações demonstraram ser dependentes da dose e duração e potencialmente reversíveis, especialmente após exposição a doses mais baixas.¹⁷

Os níveis de cotinina no líquido seminal são mais elevados nos fumadores, e os níveis desta substância no líquido seminal demonstraram uma correlação positiva entre o número de cigarros fumados por dia e a duração do seu consumo.^{6, 18, 19}

Metais Pesados (Cádmio e Chumbo)

Os principais componentes activos do tabaco que influenciam os parâmetros seminais são os metais pesados, tais como o chumbo e o cádmio.⁸

De facto, verificou-se que os níveis de chumbo no sangue eram mais elevados nos indivíduos fumadores quando comparados com não fumadores, tendo sido identificada uma correlação entre os níveis de chumbo no sangue e o número de cigarros fumados por dia. Alterações nos parâmetros seminais, nomeadamente diminuição da percentagem de espermatozóides morfologicamente normais e um aumento do dano DNA foram associados aos níveis de chumbo.²⁰

Kumosani *et al*²¹ demonstraram uma associação entre o consumo de tabaco e um aumento dos níveis de cádmio no líquido seminal, assim como uma redução significativa da motilidade dos espermatozóides nos indivíduos fumadores.

Benzopireno

O benzopireno é formado durante a combustão do tabaco e metabolizado pelo citocromo P450 em benzopireno-diol-epoxide (BPDE), que possui o potencial de se ligar covalentemente ao DNA, formando adutos BPDE-DNA. Os adutos BPDE-DNA são lesões pré-mutantes, que constituem uma potencial fonte de dano carcinogénico. De facto, demonstrou-se que o consumo do tabaco está associado à presença de adutos BPDE-DNA nos espermatozóides.²²

3.2.3 - Alterações nos Parâmetros Seminais

A maioria dos estudos que avaliam a relação do consumo do tabaco e a infertilidade masculina baseiam-se na avaliação dos parâmetros seminais.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, para que uma análise dos parâmetros seminais seja considerada insatisfatória basta preencher uma das seguintes condições: volume inferior a 1,5mL; concentração inferior a 15×10^6 espermatozóides por mL; contagem total de espermatozóides inferior a 39×10^6 espermatozóides por ejaculação; mobilidade progressiva inferior a 32% e uma morfologia com menos de 4% de formas

normais. Se forem detectadas anormalidades no número, mobilidade ou morfologia dos espermatozóides estas são designadas de oligospermia, astenospermia e teratospermia, respectivamente.²³

Tal como demonstrado na tabela 1, os estudos realizados que avaliam a relação do tabaco com os parâmetros seminais têm obtido resultados contraditórios.

Tabela 1: Estudos relevantes avaliando o efeito do consumo do tabaco nos parâmetros seminais

Autor	Ano	Tipo de Estudo	Nº de participantes	Nº de fumadores	Nº de não-fumadores	Grupo de Estudo	Associação entre os parâmetros seminais e o tabaco		
							Motilidade	Concentração	Morfologia
Trummer <i>et al</i> ²⁴	2002	Prospectivo	1104	478	517	I	Não	Não	Não
Saleh <i>et al</i> ²	2002	Prospectivo	65	20	32	I	Não	Não	Não
Kunzle <i>et al</i> ⁹	2003	Prospectivo	1786	655	1131	I	Sim	Sim	Sim
Martini <i>et al</i> ²⁵	2004	Retrospectivo	3546	372	3174	I	Não	Não	Não
Pasqualotto <i>et al</i> ²⁶	2006	Retrospectivo	889	522	367	II	Não	Não	Não
Ramlau-Hansen <i>et al</i> ²⁷	2007	Retrospectivo	2542	1052	1490	II	Sim	Sim	NA
Richthoff <i>et al</i> ²⁸	2008	Prospectivo	302	217	85	II	Não	Não	NA
Collodel <i>et al</i> ¹⁰	2010	Retrospectivo	271	118	153	I	Sim	Não	Não
El-Melegy <i>et al</i> ⁶	2011	Prospectivo	70	40	30	I	Não	Não	Sim
Yu <i>et al</i> ²⁹	2013	Prospectivo	628	314	314	I	Não	Não	NA
Hamad <i>et al</i> ¹⁸	2014	Prospectivo	54	35	19	I	Sim	Sim	NA
Yu <i>et al</i> ¹⁹	2014	Prospectivo	322	147	175	II	Não	Não	NA

Todos os estudos avaliaram os parâmetros seminais segundo as *guidelines* da Organização Mundial de Saúde em vigor à data em que o estudo foi realizado.

LEGENDA:

I: Fumadores Inférteis vs. Não-Fumadores Inférteis

II: Fumadores Férteis vs. Não-Fumadores Férteis

NA: Não aplicável

3.2.4 - Alterações na Espermatogénese

Fisiologicamente, considera-se que os testículos estão próximos do limiar da hipóxia, em parte devido às elevadas necessidades metabólicas da espermatogénese e, por outro lado, devido o seu fornecimento vascular, no qual cerca de 50 % do sangue arterial que chega ao testículo é desviado para as anastomoses artério-venosas existentes no cordão espermático.¹¹ Por este motivo, suspeita-se que a hipóxia causada pelo tabaco tenha efeitos deletérios na função testicular.⁸

Ahmadnia *et al*³⁰ realizaram um estudo em ratos expostos ao fumo do tabaco *versus* grupo de controlo, verificando uma ligeira redução na produção de espermatozóides, diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos e do número de células de Sertoli nos ratos expostos ao fumo do tabaco. Concluíram que estas alterações poderão ser induzidas pelas várias substâncias tóxicas constituintes do tabaco, comprometendo a espermatogénese, assim como pela reacção tecidual induzida pela hipóxia provocada pelo tabaco.³⁰

3.2.5 - Alterações nos Espermatozóides

Vários estudos demonstraram diversas alterações induzidas pelo tabaco nos espermatozóides.

O cálcio tem um papel importante no crescimento e diferenciação celular durante a espermatogénese e é considerado um dos principais reguladores da motilidade dos espermatozóides e dos processos de capacitação e reacção acrossómica. O gradiente de cálcio através da membrana dos espermatozóides, essencial à homeostasia e sinalização, é mantido essencialmente através da actividade da bomba Ca^{2+} ATPase. A actividade desta bomba pode ser afectada por metais pesados, nomeadamente o cádmio. Kumosani *et al*²¹ demonstraram uma associação entre o tabaco e o aumento dos níveis de cádmio no líquido seminal, assim como uma redução da actividade da bomba Ca^{2+} ATPase em fumadores férteis e inférteis. Verificaram também uma redução

significativa da motilidade dos espermatozóides nos indivíduos fumadores, sugerindo assim que a actividade da bomba Ca^{2+} ATPase poderá ter uma relação com a diminuição da motilidade dos espermatozóides.²¹

O zinco é um elemento essencial, desempenhando um papel na replicação do DNA, transcrição e síntese de proteínas, divisão e diferenciação celular. A deficiência de zinco é um efeito colateral do consumo do tabaco, estando relacionada com a reduzida actividade da bomba Ca^{2+} ATPase, diminuindo consequentemente a motilidade dos espermatozóides.²¹

A creatina cinase (CK) é uma enzima expressa por diversas células e tecidos que requerem grandes quantidades de energia. Esta enzima catalisa a conversão reversível de creatina e trifosfato de adenosina (ATP) para fosfocreatina e difosfato de adenosina (ADP), tendo como função biológica proporcionar um sistema de tamponamento de ATP para os tecidos que requerem grandes quantidades de energia. Por este motivo, a CK e o ATP são importantes fontes de energia para os espermatozóides, tendo a CK um papel importante no movimento dos espermatozóides. Ghaffari *et al*³¹ demonstraram que indivíduos fumadores apresentavam uma menor actividade dose-dependente da CK nos espermatozóides e uma relação positiva, embora estatisticamente não significativa, entre a CK e a motilidade dos espermatozóides, sugerindo assim que a reduzida actividade da CK induzida pelo tabaco poderá prejudicar a homeostase energética e comprometer a motilidade dos espermatozóides.³¹

Os espermatozóides humanos são particularmente sensíveis às espécies reactivas de oxigénio (ROS), devido à rica constituição da sua membrana em ácidos gordos polissaturados. A principal consequência do excesso de ROS é a lipoperoxidação dos elementos da membrana plasmática do espermatozóide, comprometendo a função do espermatozóide. Arabi *et al*³² determinaram que a nicotina comprometia a integridade da membrana dos espermatozóides numa relação dose-dependente.³²

3.2.6 - Alterações Cromossómicas e no DNA dos Espermatozóides

A análise dos parâmetros seminais é um componente essencial na avaliação da infertilidade, no entanto, pode falhar na detecção de defeitos nos espermatozóides.³³ De

facto, aproximadamente 15% dos homens inférteis apresentam espermogramas normais.³³ Altas proporções de DNA fragmentado no espermatozóide têm sido associado a baixas taxas de fertilização e implantação e deficiente desenvolvimento do embrião, culminando numa probabilidade de cerca de 1% em atingir uma gravidez com sucesso.^{34, 35} Os defeitos no material genómico dos espermatozóides poderão ser devido a defeitos da maturação ou condensação nuclear, quebras do DNA, defeitos na integridade do DNA ou aneuploidias cromossómicas dos espermatozóides.³³ As causas de fragmentação do DNA ainda são incertas, contudo aponta-se para que a anormal condensação da cromatina, os ROS, o stress oxidativo e a apoptose sejam as principais causas.^{18, 33}

A apoptose tem um papel muito importante na regulação do desenvolvimento das células germinativas, eliminando dos túbulos seminíferos as células danificadas, salvaguardando assim o genoma da espécie.³⁴ A apoptose é um modelo de morte celular com base num mecanismo genético que induz uma série de alterações celulares, morfológicas e bioquímicas, levando à morte celular.⁶ Nos testículos dos mamíferos, a expansão clonal é excessiva, requerendo assim um mecanismo como a apoptose para equilibrar o número de células germinativas com a capacidade de suporte das células de Sertoli.⁶ Contudo, quando este processo é incompleto, espermatozóides com DNA fragmentado são libertados, sendo a integridade do DNA essencial à transmissão da informação genética.^{6, 34} Um dos factores implicados na apoptose celular é a proteína de superfície membranar Fas, tendo um papel importante no estímulo para desencadear a via da apoptose.⁶ O processo de morte celular por apoptose é altamente regulado, requerendo, na maioria dos casos, a activação de caspases.⁶ A caspase 3 desempenha um papel central na apoptose numa ampla variedade de células, sendo que quando activada marca o ponto de não retorno dentro da cascata de sinalização apoptótica.⁶ Um estudo realizado demonstrou que homens inférteis fumadores apresentavam uma maior percentagem de fragmentação do DNA, bem como níveis mais elevados dos marcadores apoptóticos sFas e caspase 3.⁶ Verificou-se ainda que os níveis obtidos de percentagem de fragmentação do DNA e dos marcadores apoptóticos eram tanto maiores quando mais elevado o número de cigarros fumados por dia.⁶

Outra hipótese responsável pelas quebras do DNA são os ROS presentes no tracto genital masculino produzidos pelos espermatozóides decadentes e outras células.³⁴ Os ROS afectam a função dos espermatozóides, contribuindo em baixos

níveis para funções fisiológicas, contudo, em níveis excessivos são patológicos.³⁵ Num nível fisiológico, modulam a actividade de genes e proteínas vitais à proliferação, diferenciação e função dos espermatozóides.³⁵ Contudo, uma produção excessiva de ROS pelo sistema mitocondrial do espermatozóide, nos homens inférteis, está relacionada com uma retenção do citoplasma residual na peça intermédia do espermatozóide, levando à libertação de espermatozóides imaturos do epitélio germinal.^{35, 36} De facto, um estudo realizado em homens inférteis, revelou que os fumadores apresentavam um nível mais elevado de ROS que os indivíduos não fumadores.²

A condensação da cromatina dos espermatozóides ocorre durante a espermatogénese, na transição de espermatídios redondos a alongados, sendo um processo diferente do que ocorre nas células somáticas.³⁴ Ocorre uma maior condensação da cromatina, que permite ao espermatozóide manter-se transcricionalmente inerte e mais resistente à digestão enzimática.³⁴ O núcleo do espermatozóide humano é composto por um núcleo de condensação do DNA e histonas vinculadoras, que serão substituídas por proteínas de transição e estas por protaminas – protamina 1 (P1) e protamina 2 (P2), modificando o espermatozóide, de forma a tornar-se mais compacto e hidrodinâmico, promovendo a motilidade da célula e a penetração no oócito.^{19, 34} Durante o estadio de espermatídio alongado, de forma a impedir o enrolamento excessivo da cromatina, ocorrem quebras numa ou em ambas as cadeias de DNA, sendo posteriormente reparadas por pequenas proteínas nucleares que promovem a condensação do DNA.^{18, 34} Estudos demonstraram um *ratio* histona-protamina mais elevado, bem como uma diminuição da concentração da P2 nos indivíduos fumadores quando comparados com não fumadores.^{18, 19} Uma diminuição no número de espermatozóides no líquido seminal foi relacionada com uma alteração no *ratio* P1/P2.¹⁸ Considerando que as protaminas têm um papel importante na condensação do DNA, uma anormal expressão das protaminas poderá conduzir a uma espermatogénese anormal com deficiente condensação do DNA e, consequentemente, susceptibilidade aumentada para a fragmentação do DNA.^{18, 19}

Em indivíduos com oligozoospermia, alguns estudos têm demonstrado uma taxa significativamente mais elevada de aneuploidia, no entanto, a frequência desta anomalia cromossómica varia entre as populações. Esta anomalia deve-se a um defeito na espermatogénese, com uma anormal recombinação e segregação meiótica dos

cromossomas. Faure *et al* ³⁷ verificaram que efectivamente a taxa de aneuploidia era mais comum nos indivíduos inférteis fumadores.³⁷

3.2.7 - Alterações no Eixo Hipotálamo-Hipófise-Testículo

Estudos que avaliaram o perfil hormonal de indivíduos fumadores obtiveram resultados contraditórios.

Um estudo verificou que indivíduos fumadores inférteis apresentavam níveis de Testosterona mais elevados, sem outras alterações hormonais.³⁸ Ramlau-Hansen *et al* ²⁷ observaram uma relação positiva entre o consumo do tabaco e níveis elevados de Testosterona e LH em homens férteis, assim como uma mediana dos níveis de FSH e Inibina B mais elevados quanto maior o consumo diário de cigarros. Atendendo à fisiologia do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, quando os níveis de FSH e LH aumentam deverão induzir um aumento dos níveis de Testosterona e Inibina B.²⁷ Estes, por sua vez, através do mecanismo de feedback negativo, irão subsequentemente induzir uma redução dos níveis de FSH e de LH.²⁷ Contudo, os resultados apresentados neste estudo sugerem que a exposição ao tabaco pode perturbar o normal funcionamento deste sistema, levando à falência das células de Leydig nos fumadores.²⁷ Outro estudo realizado por Pasqualto *et al* ²⁶ em indivíduos férteis, concluiu que os níveis das hormonas FSH, LH e Testosterona nos fumadores não apresentavam quaisquer alterações.

3.2.8 - Alterações no Líquido Seminal

As glândulas acessórias do tracto genital masculino têm como principal função secretar o esperma, de forma a que este mantenha a homeostasia dos espermatozóides assim que eles saiam do epidídimo.⁸ O líquido seminal é constituído por vários antioxidantes enzimáticos, nomeadamente superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione transferase e ceruloplasmina e antioxidantes não-enzimáticos, tais como a albumina, vitamina A, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol),

entre outros.^{3, 39} Os antioxidantes têm um papel essencial na protecção das células germinativas masculinas, protegendo os espermatozóides dos efeitos deletérios dos ROS.^{3, 39} As enzimas superóxido dismutase e catalase são antioxidantes que têm o poder de neutralizar o excesso de radicais livres do anião superóxido e peróxido de hidrogénio, respectivamente.³

O ácido ascórbico é essencial a numerosas funções biológicas, sendo o principal antioxidante solúvel. O líquido seminal humano contém cerca de 10 mg/dL de ácido ascórbico, sendo uma quantidade consideravelmente mais elevada que a do plasma sanguíneo humano, que varia entre 0,6-2,5 mg/dL. Aparentemente, níveis mínimos de ácido ascórbico são necessários para proteger a formação e maturação dos espermatozóides. Mostafa *et al*⁴⁰ verificaram que existe uma redução significativa dos níveis de ácido ascórbico no líquido seminal dos indivíduos fumadores inférteis, assim como uma correlação positiva entre os níveis de ácido ascórbico, tanto em fumadores como não-fumadores, com a concentração, motilidade e morfologia dos espermatozóides.⁴⁰

Os ROS são bioprodutos formados por processos fisiológicos normais e pelo metabolismo celular. Para ocorrer a produção de energia é necessário a redução enzimática do oxigénio, com consequente formação de radicais livres, nomeadamente anião superóxido, peróxido de hidrogénio e radicais de hidrogénio. Estes são instáveis e muito reactivos na presença de aminoácidos, lípidos e ácidos nucleicos.³⁹

O stress oxidativo ocorre quando existe uma desproporção entre a quantidade de ROS e de antioxidantes, devido à produção aumentada de ROS, quantidade diminuída de antioxidantes ou ambas.³⁹

No líquido seminal, os principais produtores dos ROS são os leucócitos e os espermatozóides imaturos, sendo que, em condições fisiológicas, os leucócitos podem produzir 1000 vezes mais ROS em comparação com os espermatozóides.³⁹ Um estudo realizado demonstrou uma correlação positiva entre o tabaco e o aumento até 107% dos níveis de ROS e uma diminuição dos antioxidantes no líquido seminal dos homens fumadores inférteis, assim como um aumento de 48% da concentração de leucócitos no líquido seminal.^{2, 3} Contudo, o mecanismo exacto responsável pelo aumento da infiltração de leucócitos no líquido seminal ainda não é totalmente compreendido. Uma potencial explicação será que os metabolitos do tabaco poderão induzir uma reacção inflamatória no tracto genital masculino, com consequente libertação de marcadores

inflamatórios, nomeadamente interleucinas 6 e 8, que irão recrutar e activar mais leucócitos.² Por sua vez, os leucócitos activados irão produzir elevados níveis de ROS, superando a capacidade total dos antioxidantes no líquido seminal, induzindo stress oxidativo.² Outra teoria é que os metabolitos tóxicos do tabaco comprometem a espermatogénese, produzindo espermatozóides defeituosos, levando à infiltração de leucócitos no tracto reprodutor masculino de forma a eliminar estes espermatozóides por fagocitose.² Por outro lado, o próprio tabaco possui elevados níveis de ROS, facto que também poderá justificar os elevados níveis de ROS encontrados nos fumadores.²

3.2.9 - Exposição Pré-Natal ao Tabaco

Os espermatozóides não poderão ser produzidos na vida adulta se não existir uma amostra suficiente de células germinativas normais.¹¹ O mesmo acontece com as células de Sertoli, sendo essencial que as células germinativas proliferem e se diferenciem normalmente durante a vida fetal e período pós-natal, de modo a assegurar um número adequado na idade adulta.¹¹

A exposição *in utero* ao tabaco também tem sido associada a diversas alterações.

Relativamente aos parâmetros seminais na idade adulta, homens não fumadores expostos pré-natalmente ao tabaco, apresentaram uma diminuição da concentração e morfologia de espermatozóides.⁴¹

Quanto às hormonas reprodutoras relacionadas com a espermatogénese, na idade adulta, verificou-se uma diminuição dos níveis de Inibina B, no entanto, os níveis de FSH mantiveram-se inalterados. Os níveis de Inibina B correlacionam-se com a contagem de espermatozóides, indicando uma redução primária da capacidade espermatogénica testicular. A ausência de aumento compensatório dos níveis de FSH poderá indicar que o eixo hipotálamo-hipófise-testículo terá sido afectado pelo tabaco durante a gestação.⁴¹ Relativamente às hormonas relacionadas com as células de Leydig, na idade adulta, verificou-se um aumento da Testosterona livre e uma diminuição da *Sex Hormone-Binding Globuline* (SHBG), sem alteração no nível da Testosterona total. Apesar do aumento da Testosterona livre, o nível de LH manteve-se inalterado, sugerindo a possibilidade de uma alteração do *set point* do eixo-hipotálamo-

hipófise, com uma menor sensibilidade do eixo ao aumento dos níveis de Testosterona.⁴¹

Também foram descritas outras alterações, nomeadamente início precoce da puberdade, menor estatura atingida na idade adulta, índice de massa corporal mais elevado e testículos de menor tamanho. Se o nível elevado de Testosterona livre, evidenciado na idade adulta, também for elevado na adolescência poderá justificar o início precoce da puberdade, com consequente baixa estatura, devido ao período reduzido de crescimento infantil.⁴¹

Também foi demonstrado o efeito patológico da exposição pré-natal ao tabaco em ratos. Verificou-se que esta exposição está associada a uma depleção das células germinativas nos túbulos seminíferos devido a um aumento da apoptose. Uma redução no diâmetro dos túbulos seminíferos e um aumento da reparação do DNA fragmentado em células germinativas também foram evidenciadas, sugerindo que os estádios da espermatogénese são vulneráveis à exposição pré-natal do tabaco, comprometendo assim a população de células precursoras das espermatogónias e o seu desenvolvimento. Quando avaliados os parâmetros seminais, verificou-se uma redução de 55% no número de espermatozóides, uma diminuição de 67% da motilidade, bem como uma redução significativa de espermatozóides morfológicamente normais quando comparados com o grupo de controlo.⁴²

3.2.10 - Procriação Medicamente Assistida nos Fumadores

Várias técnicas de PMA são usadas para tratar a infertilidade, contudo quando o factor masculino é identificado, as mais utilizadas são a Fecundação *in Vitro* (IVF) e a Injecção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI). Vários estudos propuseram-se a avaliar o efeito do consumo do tabaco pelo parceiro masculino nestas técnicas.

Relativamente à técnica de IVF, Fuentes *et al*⁴³ concluíram que existia uma redução na taxa de gravidez de termo de 21,1% para 7,8% em casais cujo parceiro masculino era fumador quando comparados com casais em que o homem não era fumador. Neal *et al*⁴⁴ constataram uma redução de 48,3% para 20,0% na taxa de gravidez e uma diminuição de 25,0% para 12,6% na taxa de implantação no grupo de

casais em que apenas o elemento masculino era fumador quando comparado com o grupo de casais não fumadores.⁴⁴ Compararam ainda estes dois grupos com um terceiro grupo, sendo este constituído por casais em que apenas a mulher era fumadora, tendo obtido, neste grupo, uma taxa de gravidez de 19,4% e uma taxa de implantação de 12,0%.⁴⁴ Concluíram assim, que o tabaco influenciava o sucesso desta técnica e que a exposição secundária da mulher ao fumo do tabaco é igualmente deletéria à exposição activa.⁴⁴ Outro estudo também avaliou o sucesso desta técnica, comparando casais em que o homem era fumador *versus* não fumador, observando uma redução da qualidade dos embriões, traduzida pela classe atribuída ao embrião, no grupo das mulheres expostas secundariamente ao fumo do tabaco pelos seus parceiros.⁴⁵ Klonoff-Cohen *et al*⁴⁶ constataram que casais que realizaram IVF, nos quais o homem fumava, apresentavam uma taxa de gravidez múltipla cinco vezes mais elevada quando comparado com casais não fumadores e, se o homem fumasse há mais de cinco anos, esta taxa era nove vezes mais elevada. Demonstraram ainda uma diminuição de 46% do número de óocitos aspirados na mulher em casais nos quais o elemento masculino fumou durante a semana em que foi realizada a técnica de PMA, quando comparado com casais não fumadores.⁴⁶

Em casais submetidos a ICSI, Braga *et al*⁴⁷ compararam homens fumadores *versus* não fumadores, concluindo que o grupo fumador apresentava uma redução da taxa de fertilização estatisticamente significativa em relação ao outro grupo.

Capítulo 4 – Discussão

O impacto do consumo do tabaco na fertilidade masculina mantém-se um assunto controverso, sendo necessário realizar mais estudos para caracterizar melhor esta relação.

A maioria dos estudos realizados que avaliam a influência do tabaco na fertilidade masculina foram realizados em indivíduos inférteis abordados em clínicas de infertilidade. Contudo, os homens inférteis poderão não ser representativos da população geral, ou seja, estudos que demonstraram uma correlação positiva entre o tabaco e indivíduos inférteis não concluem que o tabaco foi a causa da infertilidade. Assim, é essencial realizar mais estudos em homens férteis e avaliar a relação com o tabaco.

Outro viés possível nos estudos realizados é que apesar de existirem alguns estudos prospectivos, a maioria são retrospectivos. No entanto, por razões éticas não é viável efectuar estudos prospectivos totalmente controlados e randomizados em humanos.

Capítulo 5 - Conclusão

O fumo do tabaco contém vários agentes químicos, substâncias mutagénicas e carcinogénicas que podem afectar a fertilidade masculina. Tanto o efeito directo dos constituintes tóxicos do tabaco no epitélio germinativo como perturbações induzidas no eixo hipotálamo-hipófise-testículo podem estar na base da infertilidade.

São induzidas alterações nos espermatozóides a vários níveis, nomeadamente na sua concentração, mobilidade, morfologia e alterações cromossómicas e do DNA. Também foram demonstradas alterações nos constituintes do líquido seminal relacionadas com o stress oxidativo, destacando-se o ácido ascórbico, ROS e leucócitos.

Alterações do perfil hormonal também foram detectadas, influenciando indirectamente a fertilidade masculina.

Também se destaca a influência do consumo materno de tabaco no período pré-natal, tendo consequências deletérias na fertilidade masculina na idade adulta.

Os resultados das técnicas de PMA também revelaram ser influenciados pelo tabaco, sendo que o impacto nestas técnicas poderá ser devido a efeitos directos nos espermatozóides, assim como pela exposição secundária da mulher.

Atendendo à relação demonstrada do tabaco com a infertilidade masculina é de extrema importância a adopção de medidas que encorajem a população a cessar os hábitos tabágicos.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Joaquim Nunes, por toda atenção e disponibilidade que demonstrou e pelos conhecimentos que me transmitiu para a realização desta dissertação.

À minha família, por todo o apoio que me deram ao longo destes 6 anos de curso.

Bibliografia

1. Davar, R., Sekhvat, L. & Naserzadeh, N. Semen parameters of non-infertile smoker and non-smoker men. *J. Med. Life* **5**, 465–8 (2012).
2. Saleh, R. A., Agarwal, A., Sharma, R. K., Nelson, D. R. & Thomas, A. J. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil. Steril.* **78**, 491–499 (2002).
3. Pasqualotto, F. F. *et al.* Effect of cigarette smoking on antioxidant levels and presence of leukocytospermia in infertile men: a prospective study. *Fertil. Steril.* **90**, 278–283 (2008).
4. Dai, J. *et al.* Nicotine elevates sperm motility and induces Pfn1 promoter hypomethylation in mouse testis. *Andrology* **3**, 967–978 (2015).
5. Instituto Nacional de Estatísticas. Available at: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0002243&contexto=bd&selTab=tab2. (Accessed: 7th March 2016)
6. El-Melegy, N. T. & Ali, M. E. M. Apoptotic markers in semen of infertile men: Association with cigarette smoking. *Int. Braz J Urol* **37**, 495–506 (2011).
7. Practice, T. & Medicine, R. Smoking and infertility. *Fertil. Steril.* **81**, 1181–1186 (2004).
8. Agarwal, A. & Clinic, C. Male Infertility: An Evidence-based Review. *World J Mens Heal.* **33**, 143–160 (2015).
9. Künzle, R. *et al.* Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil. Steril.* **79**, 287–291 (2003).
10. Collodel, G. *et al.* Semen quality of male idiopathic infertile smokers and nonsmokers: an ultrastructural study. *J Androl* **31**, 108–13 (2010).
11. Sharpe, R. M. Environmental / lifestyle effects on spermatogenesis. *R. Soc.* **365**, 1697–1712 (2010).
12. Esperança Pina, J. A. *Anatomia Humana dos Órgãos*. (Lidel, 2004).
13. Netter, F. H. *Atlas of Human Anatomy*. (Elsevier, 2011).

14. Guyton, A. C. & Hall, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. (Elservier, 2006).
15. Oyeyipo, I. P., Maartens, P. J. & du Plessis, S. S. In vitro effects of nicotine on human spermatozoa. *Andrologia* **46**, 887–892 (2014).
16. Kim, K. H. *et al.* Nicotine induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells. *Fertil. Steril.* **83**, 1093–1099 (2005).
17. Nesseim, W. H., Haroun, H. S., Mostafa, E., Youakim, M. F. & Mostafa, T. Effect of nicotine on spermatogenesis in adult albino rats. *Andrologia* **43**, 398–404 (2011).
18. M. F. Hamad, N. Shelko, S. Kartarius, M. M. and M. E. H. Impact of cigarette smoking on histone (H2B) to protamine ratio in human spermatozoa and its relation to sperm parameters. *Andrologia* **2**, 666–677 (2014).
19. Yu, B. *et al.* Cigarette smoking is associated with abnormal histone-to-protamine transition in human sperm. *Fertil. Steril.* **101**, 51–57.e1 (2014).
20. Hsu, P.-C., Chang, H.-Y., Guo, Y. L., Liu, Y.-C. & Shih, T.-S. Effect of smoking on blood lead levels in workers and role of reactive oxygen species in lead-induced sperm chromatin DNA damage. *Fertil. Steril.* **91**, 1096–103 (2009).
21. Kumosani, T. A., Elshal, M. F., Al-Jonaïd, A. A. & Abduljabar, H. S. The influence of smoking on semen quality, seminal microelements and Ca²⁺-ATPase activity among infertile and fertile men. *Clin. Biochem.* **41**, 1199–1203 (2008).
22. Perrin, J. *et al.* Tobacco consumption and benzo(a)pyrene-diol-epoxide-DNA adducts in spermatozoa: In smokers, swim-up procedure selects spermatozoa with decreased DNA damage. *Fertil. Steril.* **95**, 2013–2017 (2011).
23. WHO. Examination and processing of human semen. *World Heal. Organ. Edition, F*, 286 (2010).
24. Trummer, H., Habermann, H., Haas, J. & Pummer, K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum. Reprod.* **17**, 1554–1559 (2002).
25. Martini, A. C. *et al.* Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *Fertil. Steril.* **82**, 374–377 (2004).
26. Pasqualotto, F. F., Sobreiro, B. P., Hallak, J., Pasqualotto, E. B. & Lucon, A. M. Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile

- men. *BJU Int.* **97**, 324–326 (2006).
27. Ramlau-Hansen, C. H. *et al.* Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum. Reprod.* **22**, 188–196 (2007).
 28. Richthoff, J., Elzanaty, S., Rylander, L., Hagmar, L. & Giwercman, A. Association between tobacco exposure and reproductive parameters in adolescent males. *Int. J. Androl.* **31**, 31–39 (2008).
 29. Yu, B. *et al.* Cigarette smoking is associated with human semen quality in synergy with functional NRF2 polymorphisms. *Biol. Reprod.* **89**, 5 (2013).
 30. Ahmadnia, H., Ghanbari, M., Moradi, M. R. & Khaje-Dalouee, M. Effect of cigarette smoke on spermatogenesis in rats. *Urol. J.* **4**, 159–163 (2007).
 31. Ghaffari, M. A. & Rostami, M. The effect of cigarette smoking on human sperm creatine kinase activity: As an ATP buffering system in sperm. *Int. J. Fertil. Steril.* **6**, 258–265 (2013).
 32. Arabi, M. Nicotinic infertility: Assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Andrologia* **36**, 305–310 (2004).
 33. Agarwal, A. & Allamaneni, S. S. R. Sperm DNA damage assessment: A test whose time has come. *Fertil. Steril.* **84**, 850–853 (2005).
 34. Palermo, G. D., Neri, Q. V., Cozzubbo, T. & Rosenwaks, Z. Perspectives on the assessment of human sperm chromatin integrity. *Fertil. Steril.* **102**, 1508–1517 (2014).
 35. Evenson, D. P. & Jost, L. K. Sperm Chromatin Structure Assay : Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques Andrology Lab Corner. *J. Androl.* **23**, (2002).
 36. Agarwal, A., Saleh, R. A. & Bedaiwy, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* **79**, 829–843 (2003).
 37. Faure, A. K. *et al.* Predictive factors for an increased risk of sperm aneuploidies in oligo-astheno-teratozoospermic males. *Int. J. Androl.* **30**, 153–162 (2007).
 38. Lotti, F. *et al.* Current smoking is associated with lower seminal vesicles and ejaculate volume, despite higher testosterone levels, in male subjects of infertile couples. *Hum. Reprod.* **30**, 590–602 (2015).

39. Ko, E. Y., Sabanegh, E. S. & Agarwal, A. Male infertility testing: Reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertil. Steril.* **102**, 1518–1527 (2014).
40. Mostafa, T. *et al.* Effect of smoking on seminal plasma ascorbic acid in infertile and fertile males. *Andrologia* **38**, 221–224 (2006).
41. Ravnborg, T. L. *et al.* Prenatal and adult exposures to smoking are associated with adverse effects on reproductive hormones, semen quality, final height and body mass index. *Hum. Reprod.* **26**, 1000–1011 (2011).
42. Sobinoff, A. P. *et al.* Damaging legacy: Maternal cigarette smoking has long-term consequences for male offspring fertility. *Hum. Reprod.* **29**, 2719–2735 (2014).
43. Fuentes, A. *et al.* Recent cigarette smoking and assisted reproductive technologies outcome. *Fertil. Steril.* **93**, 89–95 (2010).
44. Neal, M. S., Hughes, E. G., Holloway, A. C. & Foster, W. G. Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes. *Hum. Reprod.* **20**, 2531–2535 (2005).
45. Wdowiak, A., Lewicka, M., Plewka, K. & Bakalczuk, G. Nicotinism and quality of embryos obtained in in-vitro fertilization programmes. *Ann. Agric. Environ. Med.* **20**, 82–85 (2013).
46. Klonoff-Cohen, H., Natarajan, L., Marrs, R. & Yee, B. Effects of female and male smoking on success rates of IVF and gamete intra-Fallopian transfer. *Hum. Reprod.* **16**, 1382–1390 (2001).
47. Braga, D. P. D. A. F. *et al.* Food intake and social habits in male patients and its relationship to intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil. Steril.* **97**, 53–59 (2012).